

**Substanzen mit biologischer Aktivität des Vasoaktiven
Intestinalen Peptids für die Behandlung von Interstitiellen
Lungenerkrankungen**

- 5 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von biologisch und pharmakologisch hochaktiven Peptiden für die Behandlung von interstitiellen Lungenerkrankungen, wie es die Idiopathische Pulmonare Fibrose (IPF), die Hypersensitivitätspneumonitis, oder die Diffuse Panbronchiolitis eine ist.
- 10 Die Peptide, die man laut vorliegender Erfindung für die Behandlung der oben aufgeführten Erkrankungen benutzen kann, beinhalten mindestens eine spezifische, hochkonservierte Aminosäureabfolge, die scheinbar eine wichtige Rolle in Verbindung mit den biologischen Ereignissen spielt, welche in
- 15 den besagten Krankheiten wichtig sind. Es konnte gezeigt werden, das insbesondere das bekannte und natürlich vorkommende Peptid "Vasoaktives Intestinale Peptid (VIP)" und das "Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptid (PACAP)", welche diese spezifischen Sequenzen beinhalten,
- 20 potente Wirkstoffe sind, die erfolgreich für die Behandlung von Idiopathischer Pulmonarer Fibrose und Hypersensitivitäts-pneumonitis angewendet werden können. Darüber hinaus offenbart die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen, die für die Behandlung von interstitiellen Lungenerkrankungen
- 25 nützlich sind.

Hintergrund der Erfindung

Interstitielle Lungenerkrankungen

- Interstitielle Erkrankungen sind eine heterogene Gruppe von
- 30 chronischen Entzündungsreaktionen in der Lunge. Es existieren verschiedene Formen von interstitiellen Lungenerkrankungen, wie beispielsweise die Idiopathische Pulmonare Fibrose (IPF), die Hypersensitivitätspneumonitis, oder die Diffuse Panbronchiolitis. Die im Verlauf der Erkrankungen auftretenden
- 35 pathophysiologischen Prozesse werden charakterisiert durch eine Kombination aus Gewebsverletzungen und einer übertriebenen Gewebereparatur, welche eine normale Erhaltung des zellulären Wachstums in eine progressive Narbenbildung

treibt. Charakteristische Eigenschaften dieser Reaktion beinhalten eine wiederholte Gewebszerstörung und eine intensive proteolytische Aktivität mit einer Veränderung der Zusammensetzung der extrazellulären Matrixkomponenten. Diese Vorgänge führen zu einer Verschiebung der zellulären Immunantwort hin und zu einem stark induziertem Wachstum des Mesenchymalgewebes.

Zytokine, wie der Tumornekrosefaktor alpha, und andere Vermittler des Wachstums wie der „Transforming growth factor betal (TGFbeta)“ wurden schon lange mit diesen Prozessen in Verbindung gebracht. TGFbeta ist wahrscheinlich der wichtigste Wachstumsvermittler durch seine stark anregende Wirkung auf das Wachstum des Mesenchymalgewebes und aufgrund seiner Fähigkeit, zelluläre Immunvorgänge zu verändern. TGFbeta ist dafür bekannt, in Tiermodellen schwere pulmonare Fibrosen auszulösen, wenn es selber übermäßig stark ausgebildet wird. Eine signifikant erhöhte Überproduktion dieses Wachstumsstoffes ist auch in humanen Lungenfibrosen beobachtet. Die immunverändernde Wirkung des TGFbeta ist ebenfalls bekannt. Diese beinhaltet die Inhibition der Produktion des Stoffes Interferon gamma, die Unterdrückung Interferon gamma abhängiger Immunreaktionen, als auch die Induktion immunsuppressiver CD8+ Lymphozyten. In der Tat wurde bereits seit Jahren beobachtet, dass in Patienten mit progressiven Fibrosen eine Veränderung der zellulären Immunität erfolgt, die unabhängig ist von der ursprünglichen Gewebsverletzung an sich. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass die progressive Narbenbildung in Idiopathischer Lungenfibrose einhergeht mit der Veränderung der Zytokinbalance in Richtung der sogenannten „T-Helfer Typ 2“ Reaktion. Diese Reaktion ist charakterisiert durch den Anstieg der sogenannten Th2 Zytokine wie etwa Interleukin 4 (IL-4), IL-10 und IL-13, und durch eine Verminderung bis hin zum völligen Verlust der Produktion von Interferon gamma, den Hauptmediator der sogenannten „T-Helfer Typ 1“ Reaktion. Im Gegensatz zu den chronisch entzündlichen Reaktionen in der Fibrose, ist eine akute Entzündung des Lungeninterstitiums, beispielsweise als Folge einer Infektion mit Bakterien, durch

- eine gleichzeitige Produktion der T-Helfer Typ 1 und T-Helfer Typ 2 Zytokine, wie beispielsweise des Interferons gamma, IL-12 und IL-4 gekennzeichnet. Zusätzlich dazu erfolgt auch eine gesteigerte Produktion des TGFbeta, wahrscheinlich als
- 5 Zeichen der aktivierten Wundheilung.
- Aufgrund der üblicherweise erst späten Erkennung der Idiopathischen Lungenfibrose sind die frühen zellulären Vorgänge in der Erkrankung beinahe nicht erkennbar. Die Wundheilungsintensität wird direkt beeinflusst durch
- 10 Entzündungsmechanismen, welche ihrerseits einen erhöhten Umsatz an extrazellulären Matrixkomponenten und anderer zellulären Komponenten verursachen. Chronische Entzündungen, üblicherweise durch Infektionen verursacht, führen zu pathologisch übersteigerten Wundheilungsreaktionen. Selbst im
- 15 Falle das man die entzündungsverursachenden Agentien kennt, gibt es momentan keine Medikamente auf dem Markt, mit deren Hilfe man Organfibrosen erfolgreich behandeln kann. Millionen Leute sterben durch eine langsame Zerstörung der lebensnotwendigen Organsysteme durch eine pathologische
- 20 Umstrukturierung ihrer Funktionsgewebe. Dieser Prozess wird als Fibrose beschrieben der durch fibroproliferative Mechanismen ausgelöst und gesteuert. Die einzige Lösung heutzutage sind Organtransplantationen, die mit vielen Risiken und intensiven Kosten verbunden sind.
- 25 Die fibroproliferativen Reaktionen betreffen alle Organe des Körpers. In dem Gasaustaschgewebe der Lunge kennt man es als Lungenfibrose, in der Leber als Zirrhose, in der Niere als Glomerulosclerosis. Diese Zustände werden kollektiv als fibroproliferative Erkrankungen bezeichnet. In der Fibrose
- 30 wird das gesunde Gewebe progressiv durch Bindegewebe und Unterstützungsgewebe ersetzt. Dieser Prozess basiert auf pathologisch beschleunigtem Wachstum der Gewebezellen, welche üblicherweise für die Durchführung der normalen Wundheilung zuständig sind. Deshalb definiert man die fibroproliferativen
- 35 Erkrankungen als Erkrankungen der unkontrolliert beschleunigten Wundheilung. In der Fibrose wird das funktionelle Organgewebe bis zum völligen Organfunktionsverlust ersetzt.

Heutzutage kennt man mehr als 150 verschiedene Mechanismen, durch deren Einwirkung es zu einer Beschädigung der Lunge kommen kann, was an sich wiederum eine fibroproliferative Wundheilung auslösen kann.

- 5 Zu diesen krankheitsauslösenden Mechanismen gehören chronische Infektionen, Staubexpositionen organischen oder anorganischen Ursprungs, verschiedene Medikamente und Autoimmunmechanismen. Trotzdem ist der fibrotische Prozess an sich ein eigenständiger Vorgang. Kleinere Entzündungen können
10 zu einer dramatischen Beschleunigung des Fibrosierungsprozesses führen. Chronische virale Erkrankungen sind wahrscheinlich die häufigsten Ursachen für progressive Fibrosen, trotz immunsuppressiver Behandlungen. Ähnliches gilt auch für chronische bakterielle und fungale Infektionen, mit oder
15 ohne gastrische Aufstossreaktionen, welche chronische Entzündungen der terminalen Bronchien auslösen können, die einen unmittelbaren Einfluss auf den chronischen Wundheilungsprozess in den benachbarten Alveolen haben. Auf zellulärer Ebene spielen die antigenpräsentierenden Zellen,
20 wie es die dendritischen Zellen welche sind, eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie der erwähnten Erkrankungen. Durch ihre Überfunktion aktivieren sie zu stark etwa die T-Lymphozyten, was zu einer chronischen Immunaktivierung führen kann. Deshalb sind Substanzen für die Behandlung oben-
25 genannter Erkrankungen wünschenswert, die eine Inhibition der überschüssenden Aktivität der dendritischen Zellen herbeiführen können.

Zusammenfassung der Erfindung

- 30 Die Erfindung beschreibt erstmalig die präklinisch/zelluläre und klinische Relevanz von VIP, PACAP und Substanzen mit der biologischen Aktivität von VIP oder PACAP für die Behandlung von interstitiellen Lungenerkrankungen, wie der Idiopathischen Pulmonaren Fibrose, der Hypersensitivitätspneumonitis
35 und der Diffusen Panbronchiolitis.
VIP und PACAP werden in verschiedenen Arealen des zentralen Nervensystems synthetisiert, zum Beispiel in spezifischen Gehirnregionen wie dem Hippocampus und Cortex, als auch in

peripheren Ganglien. VIP wird des weiteren von Immunzellen freigesetzt.

Vasoaktives Intestinales Peptid (VIP) :

- 5 VIP ist ein Peptid das aus 28 Aminosäuren besteht und folgende Aminosäureabfolge aufweist (vom N- zum C-terminus):

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-
Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn (SEQ ID
10 No. 1).

Gesunde Personen weisen VIP Konzentrationen von etwa 40 pg/ml Serum auf.

- VIP ist ein weitverbreitetes Neurohormon, das eine grosse
15 Anzahl physiologischer Effekte steuert, wie etwa die gastrointestinale Sekretion, die Entspannung der gastrointestinalen glatten Muskulatur, oder die Lipolyse in Adipozyten. Unter physiologischen Bedingungen ist VIP ein neuroendokriner Mediator. Berichte in der Literatur weisen auf
20 die regulatorische Wirkung von VIP bezüglich Wachstum und Proliferation sowohl in gesunden, als auch in malignen Zellen hin(Hultgardh et al. *Growth-inhibitory properties of vasoactive intestinal polypeptide. Regul.Pept. 22, 267-274. 1988*). Die biologischen Effekte werden durch spezifische
25 Rezeptoren vermittelt (VIP-R), die auf den Oberflächen verschiedener Zelltypen lokalisiert sind(Ishihara et al., *Functional expression and tissue distribution of a novel receptor for vasoactive intestinal polypeptide. Neuron 8, 811-819. 1992*). VIP beeinflusst das Wachstum maligner Zellen
30 aus Neuroblastomen, Brust-, Lungen- und Darmkrebs (Moody et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90, 4345, 1993*), indem es die eigenen Rezeptoren induziert. In einigen Fällen induziert das VIP dosisabhängig Zellteilung (Wollman et al., *Brain Res., 624, 339, 1993*). VIP und biologisch funktionelle
35 Analoge und Derivate weisen entspannende Wirkung auf glatte Muskulatur auf(Maruno et al., *VIP inhibits basal and histamine-stimulated proliferation of human airway smooth muscle cells. Am.J.Physiol. 268, L1047-L1051, 1995*), zeigen

bronchodilatorische Aktivität ohne starke cardiovaskuläre Nebeneffekte, haben Effekte in Asthma, im Bluthochdruck, Impotenz, Ischaemie und in neurologischen Erkrankungen wie der Alzheimer Erkrankung (z.B. WO 9106565, EP 0536741, US 3,880,826, EP 0204447, EP 0405242, WO 9527496, EP 0463450, EP 0613904, EP 0663406, WO 9735561, EP 0620008).

VIP Rezeptoren fand man im Epithel der Trachea und der Bronchiolen. Sie sind ebenfalls auf Makrophagen, die Kapillaren umgeben exprimiert, im Bindegewebe der Trachea und Bronchien, in alveolären Wänden und in der Auskleidung der Lungenvenen und Lungenarterien. Pepiderge Nervenfasern scheinen in der Lunge für die Synthese von VIP zuständig zu sein (Dey et al., Localization of VIP-immunoreactive nerves in airways and pulmonary vessels of dogs, cat, and human subjects. Cell and Tissue Research 220, 231-238. 1981; Said, S. I. Vasoactive intestinal polypeptide (VIP) in asthma. Ann.N.Y.Acad.Sci. 629, 305-318. 1991). VIP reduziert den Widerstand im Lungengewebe (Hamasaki et al., Relaxant action of VIP on cat pulmonary artery: comparison with acetylcholine, isoproterenol, and PGE1. J.Appl.Physiol. 54, 1607-1611. 1983; Iwabuchi et al., Vasoactive intestinal peptide causes nitric oxide-dependent pulmonary vasodilation in isolated rat lung. Respiration 64, 54-58. 1997; Saga, T. and Said, S. I. Vasoactive intestinal peptide relaxes isolated strips of human bronchus, pulmonary artery, and lung parenchyma. Trans.Assoc.Am.Physicians. 97, 304-310. 1984). Weitere Studien zeigen eine hohe Expressionsrate von VIP-R in der Lunge, gekennzeichnet durch eine hohe Aufnahme rate radioaktiv markierten VIPs (Raderer et al., 123I-labelled vasoactive intestinal peptide receptor scintigraphy in patients with colorectal cancer. Br.J.Cancer 78, 1-5. 1998; Raderer et al., Iodine-123-vasoactive intestinal peptide receptor scanning in patients with pancreatic cancer. J.Nucl.Med. 39, 1570-1575. 1998; Raderer et al., Value of peptide receptor scintigraphy using (123)I-vasoactive intestinal peptide and (111)In-DTPA-D-Phe1-octreotide in 194 carcinoid patients: Vienna University Experience, 1993 to 1998. J.Clin.Oncol. 18, 1331-1336. 2000; Virgolini et al.,

Vasoactive intestinal peptide receptor scintigraphy.
J.Nucl.Med. 36, 1732-1739. 1995).

Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP):

- 5 PACAP ist ein Neuropeptid bestehend aus 38 Aminosäuren mit folgender Aminosäureabfolge (vom N- zum C-terminus):

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-
Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-
10 Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys (SEQ ID No. 2).

- Es wurden zwei Peptidformen identifiziert: PACAP-38 und das C-terminal verkürzte PACAP-27. PACAP-27, welches 68% Homologie zum VIP aufweist, hat die folgende
15 Aminosäureabfolge (vom N- zum C-terminus):

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-
Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu (SEQ ID No.
3)
20

- PACAP ist ein starker Stimulator der Adenylatcyclase und induziert somit das zyklische adenosine 3, 5 -monophosphat (cAMP) in verschiedenen Zellen. Der Wirkstoff agiert als ein Hormon des Hypothalamus als Neurotransmitter, Neuromodulator,
25 Vasodilator und neurotropher Factor. PACAP stimuliert auch die Ausschüttung von Insulin. PACAP ist als neurotropher Faktor an der Entwicklung des Gehirns während der Embryogenese beteiligt. Im entwickelten Gehirn scheint PACAP als ein neuroprotektiver Faktor zu wirken, der eine neuronale
30 Zerstörung durch multiple Verletzungen verhindert. PACAP ist weit verbreitet im Gehirn und peripheren Organen, insbesondere in der Bauchspeicheldrüse, den Gonaden und im respiratorischen Trakt. Drei PACAP Rezeptoren sind beschrieben. Der Typ I Rezeptor weist eine hohe Affinität für
35 PACAP (und eine sehr niedrige Affinität für VIP) auf, während der Typ II Rezeptor ähnliche Affinitäten für PACAP und VIP aufweist. Es gibt einen weiteren, PACAP-spezifischen Rezeptor PAC1.

In der vorliegenden Erfindung beschreiben wir den Gebrauch von bekannten Wirkstoffen, die zur Herstellung eines Medikamentes für die Vorbeugung und/oder Behandlung von interstitiellen Lungenerkrankungen, wie beispielsweise der
5 Idiopathischen Lungenfibrose, der Hypersensitivitäts-pneumonitis, oder der Diffusen Panbronchiolitis geeignet sind.

Überraschenderweise fanden wir, dass Peptide mit der hochkonservierten Dekapeptidaminosäureabfolge Arg-Lys-Gln-
10 Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu (SEQ ID No. 4) hocheffektive Hemmer der Maturierung dendritischer Zellen sind, und hocheffektiv sind wenn sie Patienten verabreicht werden, welche an Idiopathischer Lungenfibrose, an Hypersensitivitäts-pneumonitis, oder an Diffuser Panbronchiolitis leiden.
15 Substanzen werden bevorzugt, welche diese Aminosäureabfolge beinhalten und insgesamt 10 - 60, vorzugsweise 10 - 38, am meisten bevorzugt 10 - 28 oder 10 - 27 Aminosäuren beinhalten und die identischen biologischen Eigenschaften wie das VIP oder PACAP aufweisen, die ebenfalls die entsprechende
20 konservierte Aminosäureabfolge beinhalten.

Im allgemeinen wurde gefunden, dass VIP- und PACAP-ähnliche Peptide und Polypeptide, welche die obenerwähnte therapeutische Funktion und Effizienz ausüben, die folgende Aminosäureabfolge überstreichen:

25 $(A)_n$ -Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu- $(B)_m$

wobei A, B jede natürliche Aminosäure darstellt und A und B voneinander unabhängig sind; n, m sind Platzhalter mit
30 Werten von 0 - 25; n und m sind voneinander unabhängig. Der Wert von m ist vorzugsweise 4 - 18, mehr bevorzugt 5 - 15, am meisten bevorzugt 10 - 15.

Polypeptide oder Peptide, wobei $(A)_n$ (falls $n > 2$) die Tripeptidsequenz His-Ser-Asp (SEQ ID No. 14) und/oder Phe-
35 Thr-Asp (SEQ ID No. 13) in N-terminaler Richtung die oben spezifizierte Dekapeptidsequenz überstreichen (1 - 10 Aminosäurenstellen) besitzen eine erhöhte Aktivität.

Speziell verbesserte Aktivität zeigen Polypeptide, wobei
(A)_n (falls n > 2) die Bedeutung von (X)_o-Phe-Thr-Asp-(Y)_p und
(X)_o (falls o > 2) die Bedeutung von (X')_q-His-Ser-Asp-
(X'')_r hat

- 5 wobei X, Y, X', X'' eine natürliche Aminosäure darstellt; und
o, p, ist ein Platzhalter für die Werte von 0 - 11, und r, q
sind Platzhalter mit Werten von 0 - 4. Bevorzugt werden die
Werte von o und p von 0 - 8, mehr bevorzugt die Werte von 1 -
5. Bevorzugte Werte von r sind 0 - 2.
- 10 Bevorzugte Beispiele, die unter die beschriebene generische
Formel fallen, haben folgende Aminosäurenabfolgen

His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-
Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn (VIP, SEQ
15 ID No. 1);

His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-
Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-
Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys (PACAP-38, SEQ ID No. 2);

20 His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-
Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu (PACAP-27,
SEQ ID No. 3);

- 25 Zusammenfassend kann man sagen, dass die vorliegende
Erfindung folgenden Gegenstand beschreibt:
Den Gebrauch einer Substanz für die Herstellung eines
Medikamentes zur Behandlung von interstitiellen
Lungenerkrankungen wie der Idiopathischen Lungenfibrose oder
30 der Hypersensitivitätspneumonitis und deren Anwendung an
Patienten, wobei die Substanz die biologische Aktivität von
VIP oder PACAP aufweist.

Detaillierte Beschreibung

- 35 Geeignete Substanzen, welche die therapeutischen Effekte
gemäss der Erfindung aufweisen, sind jene, welche die
gleiche, aber auch verminderte oder erhöhte biologische
Aktivität des VIP oder PACAP aufweisen. Bevorzugt sind die

Substanzen gemäss der Erfindung, welche die gleiche oder erhöhte biologische Aktivität aufweisen. Alle Substanzen die in diese Gruppe fallen, überstreichen die Aminosäureabfolge Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu (SEQ ID No. 4).

- 5 Die Erfindung beinhaltet ebenfalls Derivate der offenbarten Peptide und Polypeptide mit gleicher biologischen Aktivität. Der Ausdruck "**gleiche biologische Aktivität**" bedeutet die biologische, physiologische oder therapeutische Aktivität oder Funktionalität verglichen mit den relevanten
- 10 Eigenschaften der genannten Peptide und Polypeptide, bevorzugt mit denen von VIP oder PACAP. Der Ausdruck "**Derivat**" bedeutet eine Peptidsubstanz, welche mehr oder weniger direkt vom korrespondierenden Peptid her stammt, wie etwa von VIP oder PACAP und welche durch
- 15 einige Additionen, Deletionen, Mutationen oder Modifikationen verändert werden, ohne die biologischen Eigenschaften der Ursprungspeptide zu ändern. Verwendbare VIP Derivate sind beispielsweise WO 8905857, WO 9106565, EP 0663406 und WO 9729126 (Fmoc geschütztes VIP) offenbart. Der Ausdruck
- 20 beinhaltet auch Konjugate der Peptide und Polypeptide gemäss der Erfindung, welche aus dem Ursprungspeptid oder Polypeptid bestehen und an lipophile Stoffe wie etwa Liposomen gekoppelt sind. VIP - Liposomen sind beispielsweise in WO 9527496 oder WO 9735561 offenbart und besitzen verbesserte Eigenschaften
- 25 hinsichtlich Bioverfügbarkeit und Schutz gegen proteolytische Spaltung. Darüber hinaus beinhaltet der Ausdruck auch Fragmente und leicht veränderte Fragmente wie verkürzter Formen.
- Der Ausdruck "**Analog**" bedeutet eine Substanz, welche eine
- 30 andere Struktur und Zusammensetzung verglichen mit den Polypeptiden und Peptiden der Erfindung aufweisen, bevorzugt mit der von VIP, jedoch ohne Veränderung der biologischen Eigenschaften. VIP Analoge können natürliche oder synthetische Peptide, aber auch Nichtpeptide sein. Gemäss der
- 35 Erfindung sind VIP Analoge Peptide. Beispiele für offenbarte VIP Analoge findet man in EP 0325044 (zyklische Peptide), EP 0225020 (lineare Peptide), EP 0536741 (zyklische VIP Modifikationen), EP 0405242, EP 0184309 and EP 0613904. Der

- Ausdruck beinhaltet auch VIP oder PACAP Homologe, die nicht VIP oder PACAP sind, aber grosse Strukturähnlichkeiten zu VIP aufzeigen. Solch ein VIP Homolog ist gemäss der Erfindung das PACAP selbst und dessen verkürzte Form PACAP-27. Bevorzugte
- 5 VIP/PACAP Homologe sind Peptide, welche eine oder mehrere Konsensusamino-säureabfolgen überstreichen. Beispiele hierfür sind das Peptid histidin isoleucin (PHI), Peptid histidin methionin (PHM), das Peptide "human growth hormone releasing factor" (GRF), PACAP, Secretin und Glucagon.
- 10 Der Ausdruck "**stabilisierte Form**" beschreibt ein Derivat oder Analog, wobei das Ursprungspeptid verändert wurde, um grössere Stabilität und eine erhöhte Halbwertszeit im Blut und Serum zu gewinnen. Solche stabilisierte Formen werden bevorzugt, wenn das Polypeptid durch Enzymaktivität
- 15 fragmentiert wird. Mögliche stabilisierte Formen sind zyklische Peptide oder Polypeptide, wie etwa das zyklische VIP oder das zyklische PACAP, Fusionsproteine, bevorzugt Fc-Fusionsproteine oder pegyliert Polypeptide, beispielsweise pegyliertes VIP oder PACAP. Methoden zur Herstellung solcher
- 20 Polypeptide sind im Stand der Technik bekannt. Polypeptide und Proteine können gegen Proteolyse durch Anheftung chemischer Gruppen geschützt werden. Solche Anheftungen können effektiv verhindern, dass die proteolytischen Enzyme physischen Kontakt mit der Proteinstruktur eingehen und so
- 25 die Degradation verhindern. Polyethylenglycol ist eine solcher chemischen Strukturen, die nachweislich gegen Proteolyse schützt (Sada, et al., J. Fermentation Bioengineering 71: 137-139, 1991). Zusätzlich zum Schutz gegen proteolytische Spaltungen ist bekannt, dass chemische
- 30 Modifikationen biologisch aktiver Proteine unter Umständen weitere Vorteile bieten, wie etwa die Erhöhung der Stabilität und Verweildauer in der Zirkulation, oder eine Verminderung der Immunogenität. (US. 4,179,337; Abuchowski et al., Enzymes as Drugs.; J.S. Holcerberg and J. Roberts, eds. pp. 367-383,
- 35 1981; Francis, *Focus on Growth Factors* 3: 4-10; EP 0 401 384).
- Der Ausdruck "**Fusionsprotein**" bedeutet dass eine Substanz, speziell in der stabilisierten Form aus einem Polypeptid

- gemäss der Erfindung, bevorzugt VIP oder einem VIP Derivat oder Analog, so wie PACAP, besteht, mit einem anderen Peptid oder Protein fusioniert wird. Solch ein Protein ist bevorzugt ein Immunglobulinmolekül, mehr bevorzugt ein Fragment davon, am meisten bevorzugt eine Fc-Portion eines IgG Moleküls, bevorzugt ein IgG1. Ein Fc-VIP-Fusionsprotein ist offenbart in WO 200024278 und weist eine verbesserte Halbwerteszeit im Serum und Blut auf. Ein weiteres Beispiel ist das Fc-PACAP und das FC-PACAP-27.
- 10 Die Substanz gemäss der Erfindung kann zur Herstellung eines Medikamentes oder eines Diagnostikums verwendet werden, um die pathologischen Eigenschaften in einem Individuum zu evaluieren.
- Der Ausdruck "**Individuum**" bezieht sich bevorzugt auf Säuger, insbesondere auf Menschen. Die Substanz wird in pharmazeutischen Zusammensetzungen und Formulierungen benutzt, in welchen als eine Regel, pharmazeutisch akzeptable Trägermaterialien oder Lösungsmittel eingesetzt werden. Techniken für die Formulierung und Anwendung der Substanzen
- 20 aus der vorliegenden Erfindung kann man den "Remington's Pharmaceutical Sciences" Mack Publishing Co., Easton PA, entnehmen.
- Wie hier verwendet, bedeutet der Ausdruck "**pharmazeutisch akzeptabler Träger**" einen inerten, nicht toxischen festen oder flüssigen Füllstoff.
- Für Inhalationen ist die Substanz gemäss der Erfindung bevorzugt in aerosolische Form zu bringen. Aerosole und Techniken zu deren Herstellung sind Im Stand der Technik bekannt. Aerosole, die man mittels Inhalationsapparaten appliziert und die ein Peptid oder Polypeptid der
- 30 vorliegenden Erfindung beinhalten, beispielsweise VIP oder PACAP sind bevorzugt, falls direkt pulmonale Symptome behandelt werden müssen.
- Therapeutische Einheiten der Substanz gemäss der Erfindung können täglich auf einmal, oder durch Mehrfachgabe kleinerer Dosen appliziert werden.
- 35

Kombinationstherapie

Die Substanzen der Erfindung können einem Patienten entweder als Einzelsubstanz oder in Kombination mit anderen Wirkstoffen verabreicht werden, wie etwa mit Calcium-Kanalblockern (diltiazem), Immunosuppressiven Substanzen (prednisolone), Antimikrobiellen Agentien wie Antibiotika oder Bakteriophagen, die spezifisch gegen entweder Staphylokokken, Pseudomonaden, Burkholderia, Haemophilus, Streptokokken, oder andere Bakterien in der Lunge wirken, Beta-adrenergische Rezeptor-blockierende Substanzen und Angiotensin-rezeptor-antagonisten oder Angiotensin-converting-enzyme-inhibitors (ramipril), Antiproliferative Substanzen (atorvastatin), Endothelin-rezeptor-antagonisten, (Bosentan, Altrasentan, Sitaxsentan, Enrasentan, BMS 193884, Darusentan, TBC 3711, BSF 208075, BSF 302146, SPP 301), oder anderen antiproliferativen Substanzen (D-24851, Imatinib mesylate). Die vorliegende Erfindung bezieht sich auch auf die Kombinationstherapie der offenbarten Peptide mit zumindest einem der obenerwähnten Medikamente.

Überraschenderweise fanden wir, dass die Peptide und Polypeptide, wie oben und in den Patentansprüchen definiert, insbesondere VIP und PACAP, Inhibitoren der Reifung von humanen dendritischen Zellen sind und positive Effekte in der Behandlung von Patienten mit Idiopathischer Lungenfibrose, Hypersensitivitätspneumonitis und Diffuser Panbronchiolitis aufweisen.

Beispiel

Gezeigt wird in den Figuren 1-11 der Effekt von VIP auf die Reifung von humanen dendritischen Zellen. CD 83 ist ein charakteristisches Oberflächenprotein auf ausgereiften dendritischen Zellen. Wenn sein Vorkommen auf den Zellen gering ist, so heisst das, dass die Zellen noch unreif sind und ihre biologische Funktion nicht ausüben können. Bei Anwendung von 1 micromol VIP (Fig. 5), bzw. besonders bei 9.1 micromol VIP (Fig. 9) zeigt sich ein dramatischer Rückgang der CD 83 Oberflächenmoleküle. Dieser Rückgang wird demonstriert durch den Wert M1 38.22 - bei der Messung mit

VIP 9.1 micromol - verglichen mit dem Wert M1 81.26 (Fig. 10)
 - bei der Messung unbehandelter Zellen (Fig. 1) - in der
 sogenannten fluoreszenzaktivierten Zellanalyse, bei welcher
 mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern die Zelloberflächen
 nach den entsprechenden Antigenen (in diesem Fall CD83)
 abgesucht werden. Der Effekt von VIP auf das CD 83 Molekül
 ist spezifisch, da andere Oberflächenmoleküle - wie das
 sogenannte MHC I (siehe Figuren 2, 6 und 10) oder MHC II
 (siehe Figuren 3, 7 und 11) - bei gleicher VIP-Behandlung
 sehr viel weniger unterdrückt werden. Dies zeigt sich im Wert
 M1 70.57 für MHC I bei 9.1 micromol VIP im Vergleich zum Wert
 M1 85.59 für MHC I bei unbehandelten Zellen sowie im Wert M1
 77.73 für MHC II bei 9.1 micromol VIP im Vergleich zum Wert
 M1 83.94 für MHC II bei unbehandelten Zellen.

15

Tabellen:

Unbehandelte Zellen:CD 83 Fig. 1

| Marker | % Gated | Mean |
|--------|---------|--------|
| All | 100.00 | 202.43 |
| M1 | 81.26 | 238.31 |

MHC I Fig. 2

| Marker | % Gated | Mean |
|--------|---------|--------|
| All | 100.00 | 352.27 |
| M1 | 85.59 | 398.25 |

MHC II Fig. 3

| Marker | % Gated | Mean |
|--------|---------|--------|
| All | 100.00 | 290.14 |
| M1 | 83.94 | 335.90 |

VIP (1 μ M) :CD 83 Fig. 6

| Marker | % Gated | Mean |
|--------|---------|--------|
| All | 100.00 | 108.13 |
| M1 | 69.70 | 137.30 |

MHC I Fig. 7

| Marker | % Gated | Mean |
|--------|---------|--------|
| All | 100.00 | 200.61 |
| M1 | 78.69 | 242.97 |

MHC II Fig. 8

| Marker | % Gated | Mean |
|--------|---------|--------|
| All | 100.00 | 170.33 |
| M1 | 77.41 | 207.21 |

5 VIP (9.1 μ M) :CD 83 Fig. 10

| Marker | % Gated | Mean |
|--------|---------|--------|
| All | 100.00 | 76.48 |
| M1 | 38.22 | 143.06 |

MHC I Fig. 11

| Marker | % Gated | Mean |
|--------|---------|--------|
| All | 100.00 | 136.67 |
| M1 | 70.57 | 174.61 |

MHC II Fig. 12

| Marker | % Gated | Mean |
|--------|---------|--------|
| All | 100.00 | 175.73 |
| M1 | 77.73 | 213.25 |

Verwendete Abkürzungen:

- 5 VIP = Vasoaktives Intestinale Peptid
PACAP = Pituitary Adenylate Cyclase-activating Polypeptid
IPF = Idiopathische Pulmonare Fibrose
TGFbeta = Transforming growth factor betal
cAMP = Zyklisches Adenosine 3, 5 -monophosphat
10 PHI = Peptid histidin isoleucin
PHM = Peptid histidin methionin
GRF = Peptide "human growth hormone releasing factor"
CD 83 = Cluster of Differentiation Nummer 83
MHC I = Major Histocompatibility Complex class 1 antigen
15 MHC II = Major Histocompatibility Complex class 2 antigen

Patentansprüche

1. Verwendung einer Substanz für die Herstellung eines
Medikamentes für die Behandlung von Patienten die an
einer Lungenkrankheit leiden, die direkt oder indirekt
5 mit Idiopathischer Pulmonarer Fibrose, Hypersensiti-
vitätspneumonitis, oder Diffuser Panbronchiolitis
assoziiert sind, wobei die besagte Substanz ein Peptid
oder ein Polypeptid ist, welches die folgende
Aminosäureabfolge beinhaltet:
10 Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu (SEQ ID No. 1).
2. Verwendung gemäss Anspruch 1, wobei das besagte Peptid
oder ein Polypeptid des weiteren eine Aminosäureabfolge
folgender Sequenz überstreicht:
15 His-Ser-Asp (SEQ ID No. 14); Phe-Thr-Asp (SEQ ID No. 13).
3. Verwendung gemäss Anspruch 1 wobei das besagte Peptid
oder ein Polypeptid folgende Aminosäureabfolge aufweist:
(A)_n-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-(B)_m
20 wobei A, B ist jede natürlich vorkommende Aminosäure, A
und B sind voneinander unabhängig; und n, m ist ein
Platzhalter für Werte von 0-25; n und m sind unabhängig
voneinander.
- 25 4. Verwendung gemäss Anspruch 3, wobei, falls n > 2, (A)_n
folgende Sequenz aufweist:
(X)_o-Phe-Thr-Asp-(Y)_p
wobei X, Y ist jede natürliche Aminosäure, X und Y sind
voneinander unabhängig; und o, p ist ein Platzhalter für
30 die Werte von 0-11, o und p sind voneinander unabhängig.
5. Verwendung gemäss Anspruch 4, wobei, falls o > 2 (X)_o
folgende Sequenz aufweist:
(X')_q-His-Ser-Asp-(X'')_r
35 wobei X', X'' ist jede natürliche Aminosäure, X' und X''
sind voneinander unabhängig; und r, q ist ein

Platzhalter für die Werte von 0-4, r und q sind voneinander unabhängig.

6. Verwendung gemäss Anspruch 3, wobei die Sequenz des beschriebenen Peptids oder Polypeptids aus folgender Gruppe ausgewählt ist:
- (i) Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu (SEQ ID No. 4);
 - (ii) Phe-Thr-Asp-X¹-X²-X³-X⁴-X⁵-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn (SEQ ID No. 5)
 - (iii) Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn (SEQ ID No. 6);
 - (iv) Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu (SEQ ID No. 7);
 - (v) His-Ser-Asp-X¹-X²-Phe-Thr-Asp-X³-X⁴-X⁵-X⁶-X⁷-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu (SEQ ID No. 8);
 - (vi) His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu (SEQ ID No. 9),
 - (vi) His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu (SEQ ID No. 10);
 - (vii) His-Ser-Asp-X¹-X²-Phe-Thr-Asp-X³-X⁴-X⁵-X⁶-X⁷-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-X⁸-X⁹-X¹⁰-X¹¹ (-X¹²) (SEQ ID No. 11);
 - (viii) His-Ser-Asp-Ala-Val-Phe-Thr-Asp-Asn-Tyr-Thr-Arg-Leu-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Asn-Ser-Ile-Leu-Asn (VIP, SEQ ID No. 1);
 - (ix) His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu (PACAP-27, SEQ ID No. 2);
 - (x) His-Ser-Asp-X¹-X²-Phe-Thr-Asp-X³-X⁴-X⁵-X⁶-X⁷-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-X⁸-X⁹-X¹⁰-X¹¹-X¹²-X¹³-X¹⁴-X¹⁵-X¹⁶-X¹⁷-X¹⁸-X¹⁹-X²⁰-X²¹-X²² (SEQ ID No. 12);
 - (xi) His-Ser-Asp-Gly-Ile-Phe-Thr-Asp-Ser-Tyr-Ser-Arg-Tyr-Arg-Lys-Gln-Met-Ala-Val-Lys-Lys-Tyr-Leu-Ala-Ala-Val-Leu-Gly-Lys-Arg-Tyr-Lys-Gln-Arg-Val-Lys-Asn-Lys (PACAP-

38, SEQ ID No. 3);

wobei $X^1 - X^{22}$ ist jede natürliche Aminosäure.

- 5 7. Verwendung gemäss der Ansprüche 1-6, wobei jedes der
 genannten Peptide oder Polypeptide ein Analog oder
 Derivat mit gleicher biologischer Funktion ist.
- 10 8. Verwendung gemäss Anspruch 7, wobei jedes der
 genannten Peptide oder Polypeptide in einer
 stabilisierten Form vorliegt.
- 15 9. Verwendung gemäss der Ansprüche 1-8, wobei die
 genannte Erkrankung Idiopathische Pulmonare Fibrose
 ist.
- 20 10. Verwendung gemäss der Ansprüche 1-8, wobei die
 genannte Erkrankung Hypersensitivitätspneumonitis ist.
- 25 11. Verwendung gemäss der Ansprüche 1-8, wobei die
 genannte Erkrankung Diffuse Panbronchiolitis ist.
12. Verwendung gemäss der Ansprüche 1-8, wobei die
 therapeutisch wirksamen Peptide in Aerosolen
 appliziert werden.

Page 1

SEQUENCE LISTING

<110> Mondobiotech Laboratories Anstalt

<120> Substanzen mit biologischer Aktivität des Vasoaktiven Intestinalen Peptids für die Behandlung von Interstitiellen Lungenerkrankungen

<130> PMB-0304 INT

<150> CH 01229/03

<151> 2003-07-14

<160> 14

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
20 25

<210> 2

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu Gly Lys Arg Tyr Lys
20 25 30

Gln Arg Val Lys Asn Lys
35

<210> 3

<211> 27

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Ala Ala Val Leu
20 25

<210> 4

Page 2

<211> 10
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu
1 5 10

<210> 5
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(8)
<223> X is any naturally occurring amino acid residue

<400> 5

Phe Thr Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys
1 5 10 15

Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
20

<210> 6
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6

Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys
1 5 10 15

Tyr Leu Asn Ser Ile Leu Asn
20

<210> 7
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7

Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln Met Ala Val Lys Lys
1 5 10 15

Tyr Leu

<210> 8
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(5)
<223> X is any naturally occurring amino acid residue

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(13)
<223> X is any naturally occurring amino acid residue

<400> 8

His Ser Asp Xaa Xaa Phe Thr Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu
20

<210> 9
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

His Ser Asp Ala Val Phe Thr Asp Asn Tyr Thr Arg Leu Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu
20

<210> 10
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

His Ser Asp Gly Ile Phe Thr Asp Ser Tyr Ser Arg Tyr Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu
20

<210> 11
<211> 28
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (4)..(5)
<223> X is any naturally occurring amino acid residue

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (9)..(13)

<223> X is any naturally occurring amino acid residue

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(28)

<223> X at positions 24 -27 may be any naturally occurring amino acid residue; X at position 28 may be H or any naturally occurring amino acid residue

<400> 11

His Ser Asp Xaa Xaa Phe Thr Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25

<210> 12

<211> 38

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (4)..(5)

<223> X is any naturally occurring amino acid residue

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (9)..(13)

<223> X is any naturally occurring amino acid residue

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (24)..(38)

<223> X is any naturally occurring amino acid residue

<400> 12

His Ser Asp Xaa Xaa Phe Thr Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Arg Lys Gln
1 5 10 15

Met Ala Val Lys Lys Tyr Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35

<210> 13

<211> 3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 13

Phe Thr Asp

1

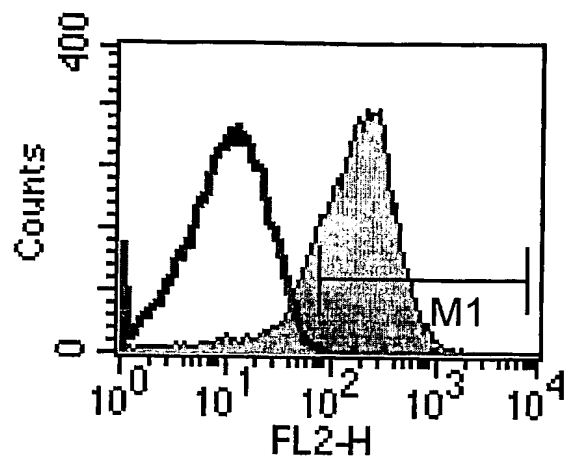
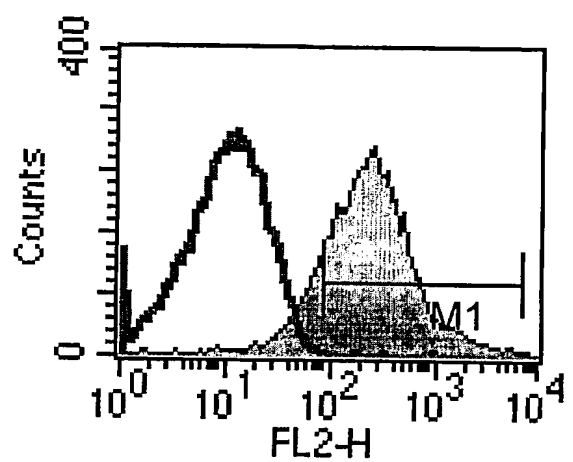
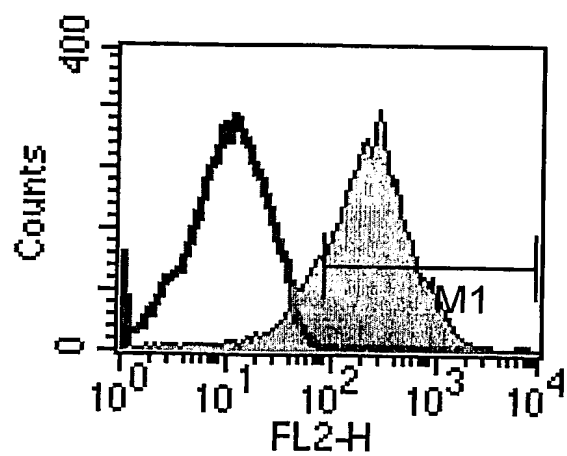
<210> 14
<211> 3
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

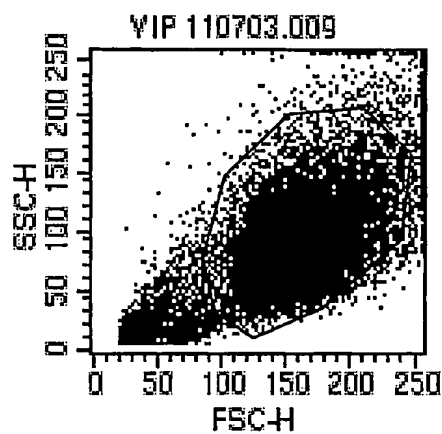
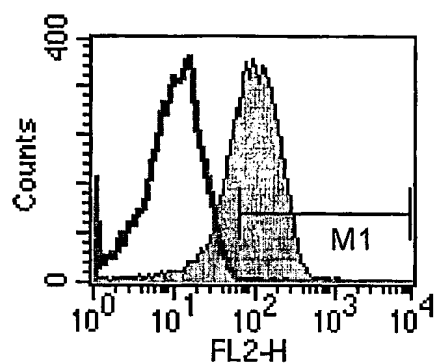
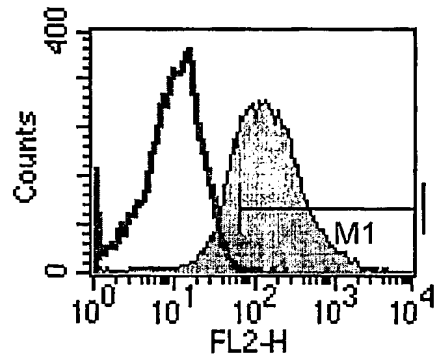
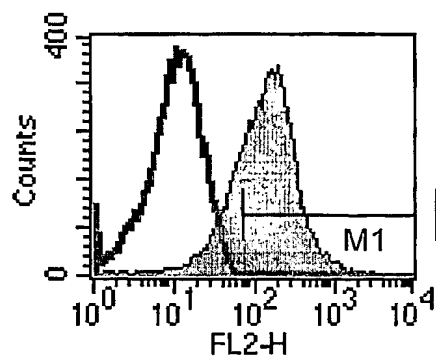
His Ser Asp

1

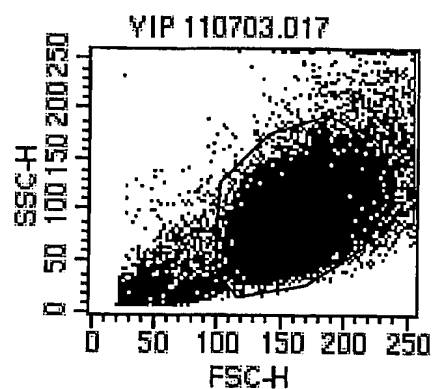
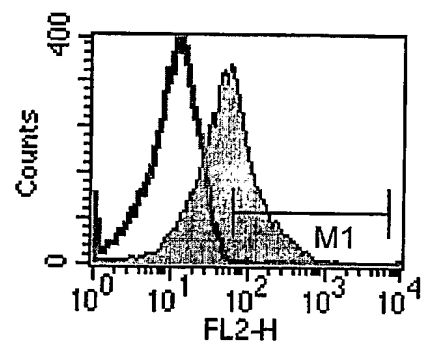
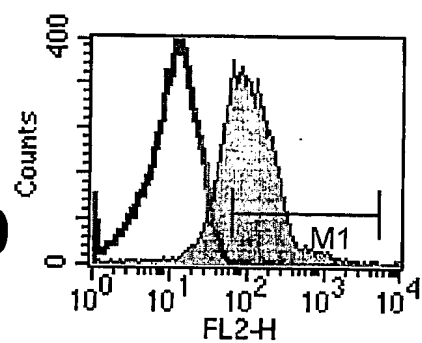
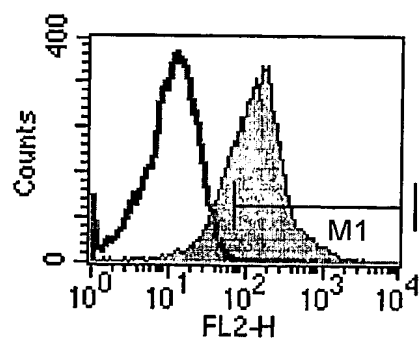
1/3

Fig. 1**Fig. 2****Fig. 3**

2/3

Fig. 4**Fig. 5****Fig. 6****Fig. 7**

3/3

Fig. 8**Fig. 9****Fig. 10****Fig. 11**

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.